

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE D'ANGERS

ANNEE 1971

N° 9

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

Diplôme d'Etat

par

Pierre JALLET

né le 12 Septembre 1940 à BRIZAMBOURG (Charentes-Maritimes)

Présentée et soutenue publiquement le - 6 JUIL. 1971

Le transport actif des cations
à travers les membranes biologiques

Président : Monsieur le Professeur GUERIN

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE D'ANGERS

ANNÉE 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

Diplôme d'État

par

Pierre JALLET

né le 12 Septembre 1940 à BRIZAMBOURG (Charentes-Maritimes)

Présentée et soutenue publiquement le

**Le transport actif des cations
à travers les membranes biologiques**

Président : Monsieur le Professeur GUERIN

F A C U L T E M I X T E
de M E D E C I N E et de P H A R M A C I E d ' A N G E R S

16, Bd Daviers - 87.76.22

DOYEN	M. RENIER	19, rue La Fontaine
Assesseur ...	M. GERMAIN	18, quai des Carmes
Secrétaire ..	M. MAILLEUX	23, rue Rousseau

DOYEN HONORAIRE	M. ROUCHY	1, place de Lorraine
PROFESSEURS HONORAIRES	(M. AMSLER	8, rue de Bel-Air
	(M. DAVID	6, rue de la Gare
	(M. ROUSSEAU	12 bis rue des Arènes
	(M. HY	4 bis rue Hanneloup

PROFESSEURS TITULAIRES

M.M.	COTTIN	Chimie Générale
	DELAITRE	Clinique Médicale Infantile
	DESJOBERT	Pharmacie Chimique
	FRESSINAUD	Clinique Médicale B
	GERMAIN	Botanique et Cryptogamie
	GOYER	Clinique Chirurgicale B
	GUERIN	Biophysique Médicale
	GUNTZ	Anatomie
	HERISSET	Matière Médicale
	HERMANN	Clinique Ophtalmologique
	JOLIVET	Chimie Analytique
	LAFARGUE	Pharmacie Galénique
	MARTIN	Pathologie Chirurgicale
	MENARD	Hygiène et Médecine Sociale
	NAULLEAU	Clinique Chirurgicale
	OURY	Clinique Pneumo-Phtisiologique
	PERREAU	Clinique Médicale A
	REBEL	Histologie
	RENIER	Clinique Rhumatologique
	ROUCHY	Clinique Gynécologie et Obstétricale
	SIMARD	Anatomie Pathologique

PROFESSEUR TITULAIRE à TITRE PERSONNEL

HOCQUET

Parasitologie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545912_0023

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.M.	BONNIOT	Clinique Médicale B
	JOUBAUD	Médecine Générale et expérimentale
	PARSY	O.R.L.
	PERTUS	Urologie
	ROGNON	Chirurgie Générale
	TADEI	Médecine Générale et Cardiologie

AGREGES

M.M.	GOLDEWSKI	Neurologie
	TESTARD	Pédiatrie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M.M.	ALLAIN	Pharmacologie
	AUGEREAU	Pharmacodynamie
	BREGEON	Rhumatologie
Mme	CAVELLAT	Anesthésie-Réanimation
M.M.	CAVELLAT	Anesthésie-Réanimation
	CARON	Electroradiologie
	COULLAUD	Physiologie
	DESNOS	O.R.L.
	EMILE	Neurologie
	FRESNEAU	Médecine Interne
	GIRAULT	Biochimie Médicale
	GROSIEUX	Gynécologie-Obstétrique
	HUREZ	Hématologie-Immunologie
	HUYGHES-DESPOINTES	Biochimie Médicale
	LARGET-PIET	Pédiatrie Génétique
	LARRA	Histologie
	PILLET	Anatomie
	PILLOT	Bactériologie
	PLANE	Chirurgie Générale
Mles	PRELOT	Physiologie-Zoologie
	QUERO	Microbiologie
M.	RIBERI	Médecine Interne
Mme	SCHNITZLER	Dermatologie Vénéréologie

DELEGUES DANS LES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

M.M.	MARTIN FRERE	Chimie Générale et Minérale
	THUILLIER	Chimie Biologique
	VALTON	Médecine Légale
	WARTEL	Psychiatrie

A Messieurs les Membres de la Faculté

Monsieur le Professeur GROSJEAN

Professeur de Microbiologie

Par délibération en date du 28 janvier 1966, la Faculté
a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui
lui seront présentées doivent être considérées comme propres
à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune appro-
bation ni improbation.

Je vous prie d'agréer, Monsieur le Professeur,
l'assurance de ma haute estime et de mon profond
respect.

Je vous prie d'agréer, Monsieur le Professeur,

l'assurance de ma haute estime et de mon profond
respect. Je vous prie d'agréer, Monsieur le Professeur,
l'assurance de ma haute estime et de mon profond
respect. Je vous prie d'agréer, Monsieur le Professeur,
l'assurance de ma haute estime et de mon profond
respect.

A notre Maître et Président de Thèse

Monsieur Le Professeur GUERIN

Professeur de Biophysique

En acceptant de présider notre
Jury de thèse, il nous fait un
très grand honneur.

Nous lui devons notre travail.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'assurance de notre profonde
reconnaissance pour la bien-
veillance et la sympathie dont
il fait preuve à notre égard.

A Monsieur Le Professeur OURY

Professeur de Clinique
de Pneumophtisiologie
Médecin des Hôpitaux

Il nous a toujours témoigné la
plus grande bienveillance dans
son service.

Nous lui exprimons notre profond
respect et notre vive gratitude
pour le riche enseignement qu'il
nous a prodigué.

A Monsieur Le Professeur TADEI

Professeur sans Chaire

Médecin des Hôpitaux

Il nous a toujours réservé
l'accueil le plus chaleureux.

Qu'il soit assuré de notre
reconnaissance et de nos
sentiments respectueux.

Monsieur Le Professeur HUYGHES-DESPOINTES

Maître de Conférence Agrégé
de Biochimie Médicale

Il nous fait l'honneur d'être
notre juge.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de nos sincères
sentiments.

I N T R O D U C T I O N

=====

La composition du milieu interne de toutes les cellules animales diffère notablement de celle du liquide dans lequel les cellules baignent. Ceci est très net quand on considère leurs teneurs respectives en ions en solution libre ; l'intérieur de la cellule est riche en ions potassium et anions organiques et pauvre en ions sodium et chlore, tandis qu'il en est inversement dans le milieu baignant. La raison pour laquelle ces différences ont apparu au cours de l'évolution est inconnue, mais elles sont cependant indispensables au fonctionnement correct de l'organisme. Pour ne citer que deux exemples : les gradients d'ions jouent un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux (1), et de nombreuses enzymes intracellulaires ont besoin du potassium comme cofacteur (2).

La façon la plus simple de maintenir le gradient serait d'avoir une membrane cellulaire complètement imperméable ; tou-

tefois, des expériences avec des traceurs radioactifs ont montré que la membrane permet à tous les petits ions et à un certain nombre de substances de passer, bien qu'à des taux variables. Ainsi, le maintien de gradients ioniques accusés ne peut être attribué à une membrane totalement imperméable, et il est donc nécessaire d'admettre qu'un travail constant s'effectue pour les maintenir.

Dans les cellules excitables, comme celles du tissu nerveux et du tissu musculaire, la génération des signaux électriques fait intervenir le mouvement des ions le long de leurs gradients de concentration uniquement par modification de la perméabilité sélective de la membrane. Dans ces tissus, un moyen de rétablir les gradients est indispensable si le fonctionnement doit être maintenu. La nécessité d'un tel système fut conçu dès 1902 par le physiologue allemand E. Overton qui montra que le myocarde de l'homme fait quelques $2,4 \cdot 10^{-9}$ contractions en 70 ans et cependant renfermait une aussi grande quantité de potassium et une aussi petite quantité de sodium dans la vieillesse que dans la jeunesse. Bien que le muscle et le nerf aient été des tissus d'élection pour l'étude des mécanismes en jeu dans les productions et le maintien des gradients d'ions, des mécanismes analogues sont observés à un degré variable dans toutes les cellules, et les hématies sont un autre matériel expérimental qui a été beaucoup utilisé.

En examinant le mouvement des ions à travers les membranes cellulaires, le gradient de concentration de l'ion n'est pas le seul facteur qui doit être considéré. La plupart des membranes cellulaires sont polarisées, l'intérieur de la cellule étant négatif par rapport à l'extérieur, et ce potentiel peut aider ou gêner le mouvement des ions le long de leurs gradients de concentration. Ainsi la négativité de l'intérieur de la cellule rend l'absorption des ions potassium beaucoup plus faible que le suggère le gradient de concentration opposé, et de fait, si le potentiel est assez grand, les ions potassium seront entraînés passivement à l'intérieur de la cellule le long du gradient chimique. Au contraire, les gradients chimique et électrique sont opposés au mouvement du sodium hors de la cellule, et de l'énergie doit être utilisée dans ce mouvement. Le processus par lequel il est réalisé est connu sous le nom de transport actif ou pompe à sodium et est défini par Ussing (3) comme un transfert d'ions contre un gradient électrochimique.

Avant de considérer et d'analyser cette propriété, nous rappellerons brièvement les dernières notions acquises quant à l'ultrastructure des membranes.

I) ULTRASTRUCTURE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

D'une manière très générale, la membrane comporte des lipides, des protéines et de l'eau. Nos connaissances sont encore très incomplètes au sujet de l'eau, mais il apparaît que son rôle est capital et qu'elle contrôle en fait la structure de la membrane en intervenant sur les associations lipides-protéines.

Les forces qui président à l'arrangement des molécules de lipides et de protéines dans la membrane sont essentiellement :

- les forces d'interaction ions-dipôles, ions-ions
- les forces de dispersion
- les forces entropiques, c'est-à-dire l'ensemble des contraintes physico-chimiques qui amène la membrane à adopter l'organisation nécessitant le minimum d'énergie libre.

Si l'on rapporte la quantité de lipides extraite des membranes des globules rouges à la surface des globules, on s'aperçoit que les molécules sont en nombre suffisant pour former, disposées côte à côte, une couche double tout autour

de la cellule. D'autre part, les phospholipides purs en suspension dans l'eau donnent spontanément des structures bilamellaires. Ces données conduisirent Danielli (4) en 1935 à proposer l'hypothèse suivante : la membrane serait constituée d'une couche double de molécules lipidiques réunies par leurs extrémités hydrophobes et intercalées entre deux feuillets protéiniques qui formeraient les surfaces interne et externe (fig. I). La pénétration des ions et des molécules solubles dans l'eau à travers une telle barrière lipidique étant difficile à expliquer, on a plus récemment avancé l'hypothèse d'une invagination des couches de protéines au travers des fibres de lipides, ce qui aurait pour effet de faciliter le transit de ces espèces.

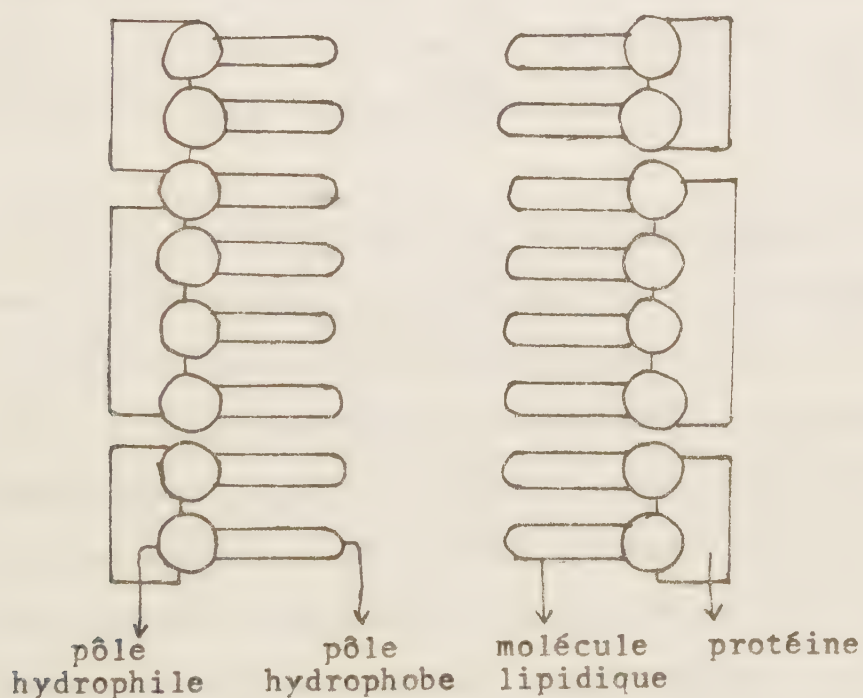


Fig. I : Schéma de Danielli

Vingt ans plus tard, le microscope électronique permet de constater que les membranes d'un grand nombre de cellules présentent une structure très semblable au modèle proposé par Danielli (Fig.2). Ce qui amène Robertson (5) à émettre l'hypothèse que la couche double constitue la structure fondamentale de toutes les membranes biologiques : c'est le "Unit Membrane" des anglosaxons. D'un point de vue thermodynamique, cette organisation en couche double est assez satisfaisante pour expliquer la stabilité de la membrane. Le calcul des énergies de stabilisation d'une couche double de phospholipides montre que cette structure correspond bien au maximum de stabilité. Mais rien ne prouve que la stabilité de la membrane soit due aux seuls éléments lipidiques. Il est probable que les protéines et l'eau y contribuent de manière non négligeable, ce qui pourrait expliquer la raison pour laquelle les membranes biologiques vues au microscope électronique présentent souvent un aspect granulaire.

Lucy (6) explique cet aspect granulaire de la membrane observée au microscope électronique par l'existence de globules lipidiques. Selon lui, la membrane serait constituée de sous unités globulaires lipidiques enrobées de protéines et de glycoprotéines (Fig.3). A l'intérieur de ces sous unités ou micelles, les molécules de lipides seraient orientées radialement, les extrémités hydrophobes étant dirigées vers le centre, les extrémités hydrophiles vers la périphérie. Les micelles formeraient un film continu noyé dans un ciment de protéines ou de

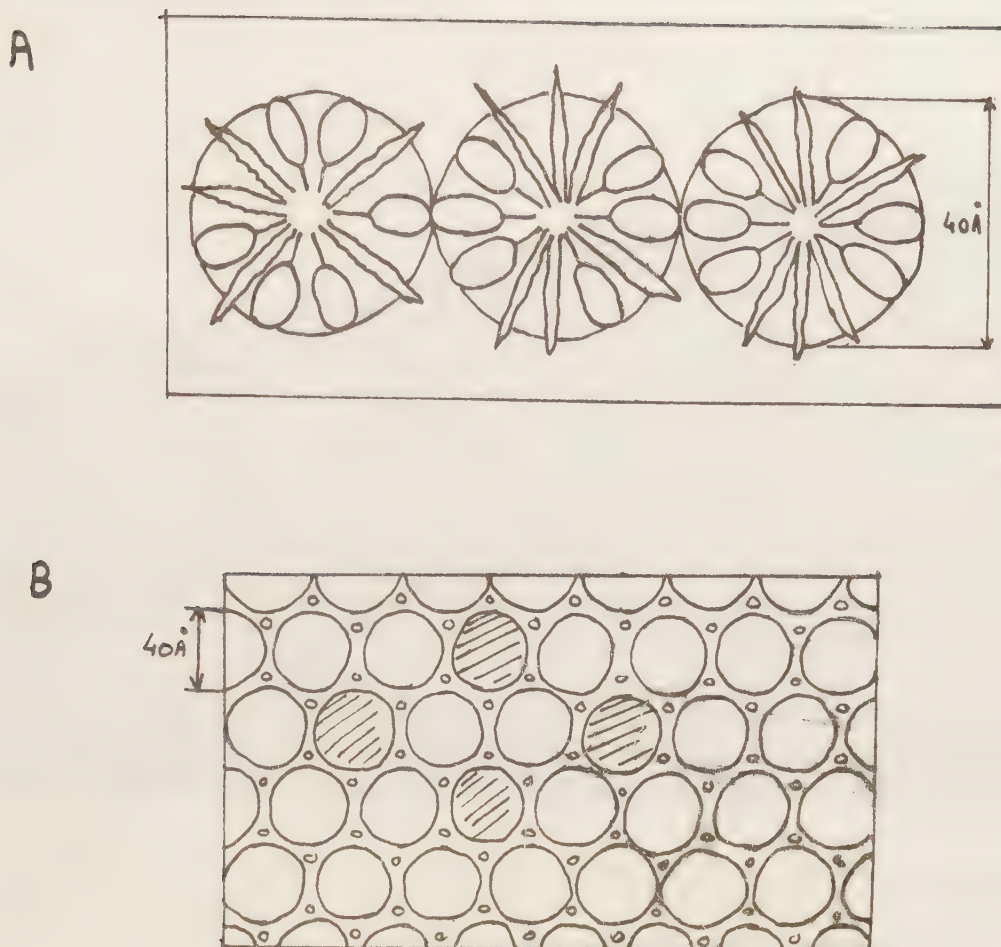


Fig.3 : Modèle d'organisation moléculaire de la membrane biologique proposée par Lucy.

A : coupe transversale - film continu de sous-unités globulaires lipidiques, ou micelles, noyées dans un ciment de protéines.

 phospholipides

 cholestérol

B : Section plane : La membrane apparaît constituée de la juxtaposition de micelles lipidiques d'un diamètre de 40 Å. Les cercles ombrés correspondent aux protéines globulaires.



Fig.2: Membrane de globules rouges humains vue au microscope électronique.

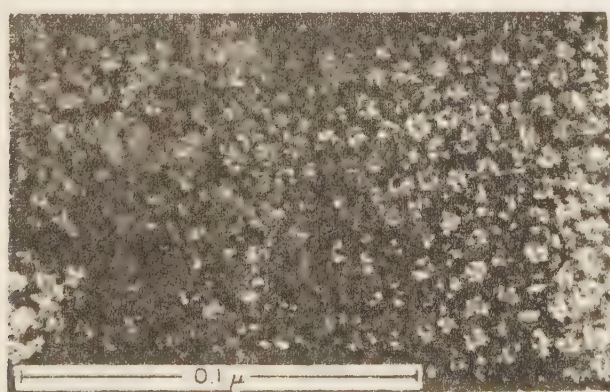


Fig.4: Aspect granulaire de la membrane.

glycoprotéines. Des pores de diamètre $4\text{\AA}$ traverseraient l'épaisseur de la membrane et en certains points du réseau, il y aurait des protéines globulaires douées de propriétés enzymatiques ou hormonales. Ce modèle a l'avantage de rendre assez bien compte de la perméabilité de la membrane et des phénomènes de transport actif.

En 1965, Benson (7) proposait un autre modèle structural également compatible avec l'aspect granulaire de la membrane (Fig.4). Selon lui, la membrane serait constituée d'une seule couche de sous-unités lipoprotéiques dans laquelle il attribue le rôle principal aux protéines qui constituent les squelettes de ce schéma général alors que Danielli et Lucy le conferraient aux lipides. D'ailleurs, à l'aide de détergents qui interviennent au niveau des liaisons hydrophobes des lipoprotéines, on a réussi à isoler des sous-unités lipoprotéiques enzymatiquement actives.

Enfin, selon plusieurs auteurs, l'organisation structurale de la membrane serait très plastique et dépendrait pratiquement de l'état fonctionnel. Ainsi, les différentes structures observées au microscope électronique (micelles ou couches doubles) seraient en quelque sorte des instantanés de membranes saisies à différents moments de leur activité.

.../...

Deux méthodes viennent arbitrer les interprétations des images obtenues au microscope électronique :

I) LA MESURE DE LA DISPERSION ROTATOIRE OPTIQUE

On sait, depuis Biot, qu'un certain nombre de cristaux (tel que le quartz) font tourner le plan de polarisation de la lumière ; en effet, après avoir placé un analyseur et un polariseur à 90° l'un de l'autre (extinction de la lumière), il est connu qu'en plaçant une lame de quartz entre analyseur et polariseur, la lumière est plus ou moins rétablie et qu'il faut faire tourner le polariseur d'un certain angle pour rétablir l'extinction.

α , l'angle dont a tourné un plan de polarisation est proportionnel à l'épaisseur de la lame de quartz. Le quartz est composé de molécules (SiO_2) qui ne sont pas superposables à leurs images dans un miroir ; toute molécule douée de cette propriété fait tourner le plan de polarisation de la lumière, en particulier, les molécules possédant un carbone asymétrique. Une solution de protéines fera donc tourner le plan de polarisation de la lumière d'un angle proportionnel à sa concentration. De telles molécules, quartz, protéines, sont dites optiquement actives. L'eau et les solvants aqueux ne le sont pas.

La valeur de α dépend de la longueur d'onde de la lumière : cette variation est la dispersion optique rotatoire.

La rotation du plan de polarisation provient de la différence des indices des deux ondes circulaires tournant en sens opposé, ces deux ondes circulaires ayant pour origine la décomposition de l'onde polarisée rectiligne. Au voisinage de bandes d'absorption, ces deux ondes diffèrent entre elles, non seulement par leur indice de réfraction, mais aussi par des absorptions différentes. Dans ces conditions, l'onde qui sort du milieu actif a non seulement tourné d'un angle α , mais n'est plus rectiligne (elliptique). L'étude au voisinage des bandes d'absorption de la différence des indices ou de la différence des coefficients d'absorption des deux ondes circulaires constitue l'étude du dichroïsme circulaire.

Les protéines font tourner le plan de polarisation de la lumière, non seulement parce qu'elles contiennent des carbones asymétriques, mais parce qu'elles peuvent avoir une configuration tertiaire elle-même asymétrique ; par exemple, en hélice (une hélice n'est jamais superposable à son image dans le miroir).

Ainsi, les techniques de polarisation rotatoire permettent de préciser la structure tertiaire de nombreuses protéines (hé-

lice α - feuillets pliés ou pelotes statistiques).

Ces techniques ont été appliquées à l'étude de la conformation des protéines des membranes biologiques. Les spectres de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire obtenus avec les membranes de globules rouges ont été comparés avec ceux de la poly L lysine et de l'acide poly L glutamique. Les résultats obtenus (8) suggèrent que les protéines membranaires se présenteraient selon deux configurations : structure hélicoïdale α - pelote statistique. D'ailleurs, les spectres Infra-rouges avaient aussi montré qu'il existait peu de forme "feuillets pliés" dans les membranes. Or, pour certains auteurs, il semble difficile de concevoir que sous la forme d'une hélice les protéines puissent s'associer aux lipides en double couche selon Danielli.

2) LA SPECTROMETRIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Cette technique consiste à appliquer un champ magnétique sur les noyaux du système. Ceux-ci se comportent comme des dipôles magnétiques et leur mouvement propre induit des champs locaux qui interfèrent avec le champ appliqué. La RMN a permis d'étudier la structure de l'eau et de montrer qu'elle entre pour 30% dans la constitution de la membrane. De plus, le mouvement Brownien des moles de lipides et protéines est faible

.../...

et leur comportement est plutôt celui d'un solide que d'un liquide.

D'autre part, entre 0°C et 50°C, il n'y a aucune apparence de changement de phase. Il est donc probable que ces molécules sont engagées fortement avec les protéines en un complexe lipoprotéique.

Ainsi, ces résultats seraient plus en faveur du modèle de Benson qui conçoit la membrane comme une couche monomoléculaire de sous-unités lipoprotéiques. Cette structure est le mode d'organisation qui se prêterait le mieux à des changements de conformation (selon les nécessités fonctionnelles). Par exemple, on a montré que le mouvement Brownien des lipides diminuait lors du transport actif du glucose à travers les membranes des globules rouges.

Une dernière notion est celle du rôle capital de l'eau en tant que constituant des membranes au même titre que protéines et lipides. Il semblerait qu'elle soit capable de subir des modifications de structure, ressemblant par exemple davantage à un solide qu'à un liquide, et rendant l'organisation de la membrane très plastique.

En fait, les membranes cellulaires sont des structures fonctionnelles et non de simples frontières physiques séparant

deux phases. Donc, la question importante n'est pas de savoir si la membrane a une structure spécifique (couche double ou micelles), mais de comprendre pourquoi elle se trouve à un moment donné dans telle ou telle conformation et comment elle contrôle ces changements pour les adapter aux nécessités de son métabolisme.

II) C A R A C T E R I S T I Q U E S D U T R A N S P O R T A C T I F D E S C A T I O N S

I) SOURCE D'ENERGIE -----

La plupart des premières expériences sur la pompe à sodium dans les tissus excitables furent faites sur les grandes cellules nerveuses des céphalopodes, le calmar en particulier. Ces cellules ont plusieurs centimètres de long et jusqu'à un millimètre de diamètre. La cellule est facilement isolée chez l'animal par dissection et reste fonctionnelle pendant plusieurs heures quand elle est maintenue immergée dans l'eau de mer. La grande taille de ces cellules permet de les manipuler suivant des procédés inapplicables aux autres cellules ; une de ces techniques est l'injection de solutions dans les cellules. En injectant des ions sodium radioactifs dans les axones du calmar, on a pu (9) étudier les propriétés de la pompe à sodium dans une seule fibre nerveuse.

On a d'abord étudié l'expulsion des ions sodium en fonction du métabolisme. Un nerf est essentiellement un tissu aérobie et ses réserves d'énergie, qui sont représentées par des composés riches en énergie, l'adénosine triphosphate (ATP) et le phosphagène, peuvent être presque complètement dégradées en intoxiquant les nerfs par le cyanure, le dinitrophénol ou l'azide. L'application de l'un de ces poisons réduisit notablement la sortie des ions sodium radioactifs des axones du calmar et le

taux auquel la sortie diminuait était étroitement parallèle à la diminution de la quantité présente de phosphates riches en énergie. L'élimination du poison permettait habituellement la resynthèse des phosphates riches en énergie et quand celle-ci réapparaissait, une augmentation parallèle de la sortie du sodium était observée. Si de l'ATP ou du phosphagène était injecté dans un axone complètement intoxiqué, mais non si ces composés étaient placés dans le milieu externe, apparaissait une brève période d'augmentation de la sortie du sodium dont l'importance dépendait de la quantité injectée d'ATP ou de phosphagène. Ces expériences suggèrent fortement que les composés phosphatés riches en énergie jouent un rôle dans l'expulsion du sodium des axones du calmar.

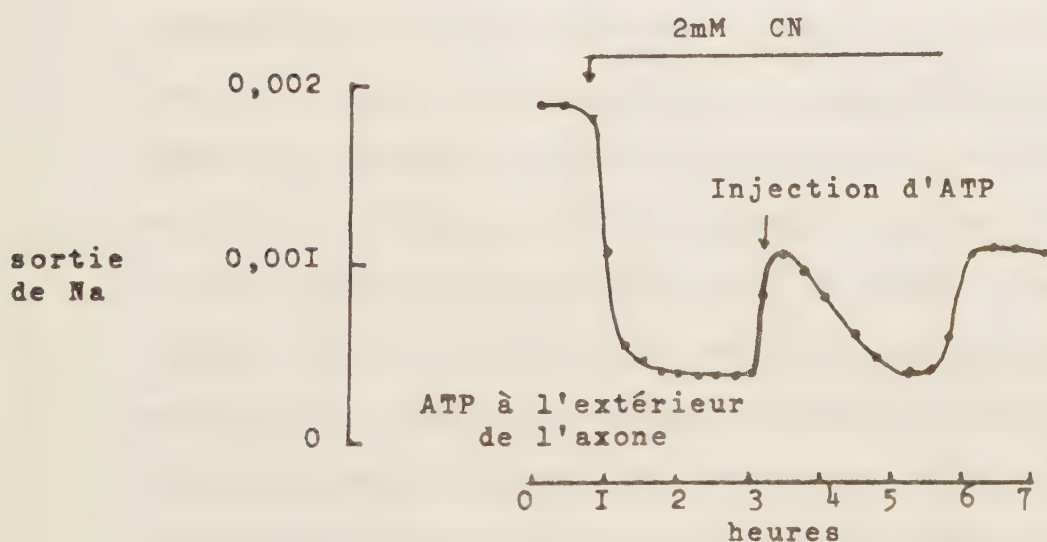


Fig.4 : Action du cyanure, poison de la respiration, sur la sortie du sodium d'un axone de calmar. La figure n'est qu'un diagramme et a pour but de montrer le genre de modifications de la sortie quand de l'ATP est retourné soit à l'extérieur, soit à l'intérieur d'un axone intoxiqué. La sortie de sodium est exprimée par la fraction de sodium radioactif (^{22}Na) perdue par minute.

Des preuves identiques existent pour les hématies. Si celles-ci sont laissées à une température basse (4°C environ), on s'aperçoit que les gradients de concentration diminuent jusqu'à disparition complète. Si on place ces mêmes hématies à température physiologique, les gradients se rétablissent. Il existe une perte de potassium et un gain de sodium si dans le milieu où baignent ces cellules, il n'y a pas de glucose ou, si un inhibiteur de la chaîne métabolique, comme le fluor est présent. Une élégante méthode révèle le rôle de l'ATP dans le transport actif à travers les membranes de globules rouges (10). Si des hématies sont placées dans un milieu dilué, elles gonflent et, à mesure qu'elles gonflent, leur membrane cellulaire devient de plus en plus perméable, le résultat étant un échange rapide de substances entre la cellule et le milieu baignant. A condition qu'on ne laisse pas le processus aller trop loin, les hématies, appelées maintenant "fantômes", peuvent être rendues étanches à nouveau en les retournant dans un milieu normal. Si on fait gonfler ces cellules dans un grand volume de liquide, le contenu normal de la cellule peut être éliminé par dilution et remplacé par des constituants du milieu baignant. Le processus de rescellement permet à ces "fantômes" d'être transférés dans différents milieux sans perte de leur nouveau contenu. On constata rapidement que les "fantômes" pomperaient encore du sodium à condition qu'ils renferment des ions sodium et de l'ATP. Les autres composés phosphatés étaient de médiocres remplaçants de

l'ATP, ce qui suggère que l'ATP est la principale source d'énergie pour la pompe à sodium.

Dans beaucoup de tissus, il n'est pas nécessaire d'utiliser des isotopes radioactifs pour mettre en évidence le besoin d'énergie de la pompe à sodium. Il est souvent possible de constater une augmentation nette du taux de sodium interne après inhibition du métabolisme et une perte nette après suppression de l'inhibiteur. Ceci est particulièrement facile pour les tissus ayant une très grande surface de membrane. De bons exemples sont les coupes de cerveau et de cortex rénal et les troncs nerveux qui descendent dans les pattes du crabe. Ce dernier tissu renferme des milliers de fibres nerveuses qui ont des dimensions très différentes de celles des axones du calmar. Les fibres nerveuses n'ont souvent qu'un diamètre de 10^{-3} mm et il a été estimé que dans 1 g de nerf il y a 10^4 cm² de membrane nerveuse. Un tel tissu est idéal pour étudier la pompe à sodium et il est très facile de montrer qu'une augmentation nette importante du taux de sodium interne fait suite à l'application de cyanure sur ces nerfs. L'observation que le taux de sodium augmente quand le métabolisme est inhibé est en elle-même preuve d'un passage constant de sodium dans le nerf. Comme le taux de sodium des nerfs non intoxiqués immergés dans l'eau de mer reste constant, il faut en conclure que de l'énergie est constamment utilisée pour compenser la rentrée de sodium vers l'intérieur.

.../...

2) MOUVEMENT DES IONS - COUPLAGE $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

Le plus grand nombre de travaux sur ce sujet a été réalisé sur les globules rouges par Glynn.

L'influx de potassium et l'efflux de sodium relèvent du transport actif. L'amplitude du flux actif de K^+ est fonction de la concentration du potassium dans le milieu extracellulaire. En effet, si l'on mesure, à l'aide de l'isotope K^{42} , dans des conditions d'équilibre, l'influx de K^+ en fonction du potassium externe, on s'aperçoit que cet influx augmente avec la concentration en KCl (II).

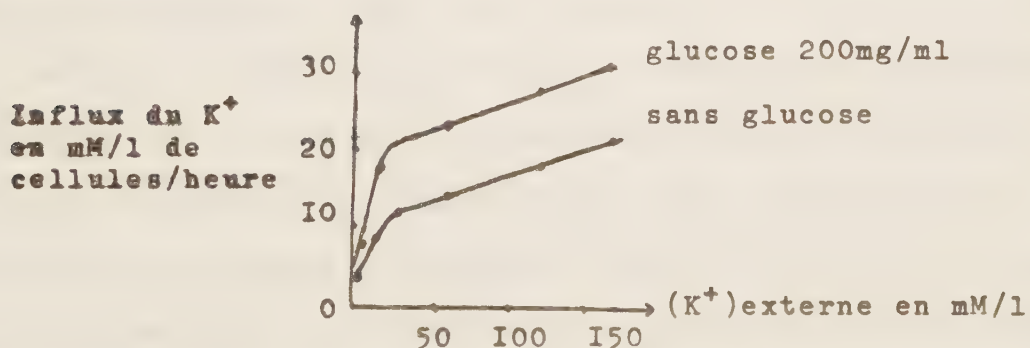


Fig. 5 : Influx du potassium en fonction de la concentration en potassium du milieu extracellulaire mesuré à 37°C avec des globules rouges humains.

La pente de cette courbe diminue lorsque le K^+ externe augmente et garde une valeur constante après une concentration de 25mM/l environ. Pour interpréter la forme de la courbe, on suppose habituellement que le potassium entre dans la cellule,

d'une part grâce au transport actif et, d'autre part par diffusion passive. La première partie représenterait le processus actif, la seconde partie linéaire la simple diffusion.

De la même façon, la sortie active du sodium est fonction de la concentration intracellulaire du sodium (12). L'influx de K^+ peut être inhibé de façon compétitive par le sodium externe. Glynn montra que l'influx de potassium mesuré en présence de sodium atteint la moitié de son maximum quand la concentration du potassium dans le milieu externe est de 2mM. Mais, quand il remplace les ions Na^+ par la choline, la moitié du maximum est atteinte pour une concentration de potassium externe égale à 0,4mM. Ainsi, pour une concentration faible de K^+ dans le milieu extracellulaire, soit 2mM, la pompe travaille plus vite sans sodium. Il est aussi possible de démontrer l'inhibition de l'efflux de sodium par le potassium interne en utilisant les fantomes de globules rouges. Ceux-ci sont préparés de telle sorte qu'ils contiennent des concentrations variables de potassium tout en conservant un sodium interne constant. Le flux de Na^+ est d'autant plus grand que le K^+ interne est faible.

Quand du sodium entre dans une cellule, il le fait habituellement en échange du principal cation interne, le potassium, et un retour à l'état initial nécessite non seulement l'expulsion du sodium de la cellule, mais aussi la réabsorption du potassium. Les deux processus sont inhibés par les poisons méta-

boliques et il est naturel de se demander si le processus de l'expulsion du sodium est d'une façon quelconque couplé à l'absorption du potassium.

Dans les fibres nerveuses et les hématies, l'élimination complète du potassium du milieu externe réduit notablement la sortie du sodium ; l'augmentation de la concentration de potassium dans le milieu augmente la sortie du sodium. Dans les hématies, Glynn montra (II) que la courbe rapportant la sortie du sodium ayant besoin d'énergie, à la concentration du potassium externe, approchait de très près d'une hyperbole équilatère, et peut être décrite par une équation de Michaelis-Menten.

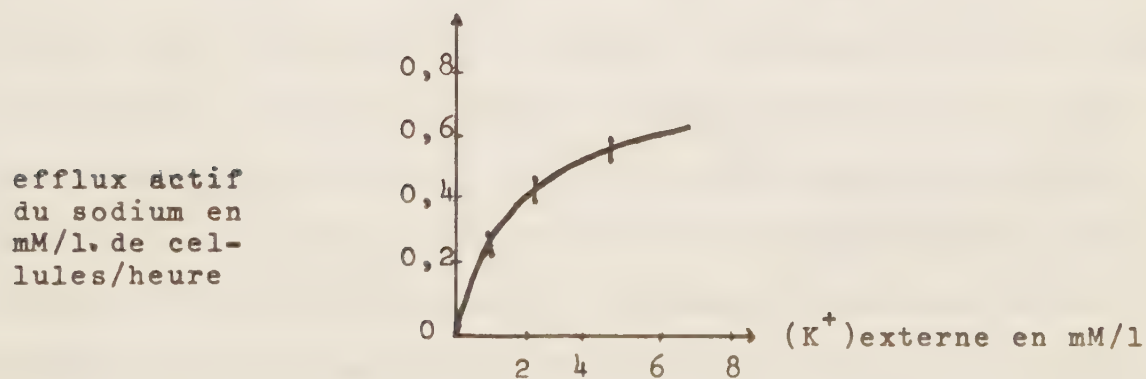


Fig.6 : Efflux actif du sodium en fonction de la concentration en potassium du milieu extracellulaire mesuré à 37°C, avec des globules rouges humains.

Une relation de ce type suggère que les ions potassium pourraient activer l'expulsion des ions sodium en se combinant

avec un site quelconque à l'extérieur de la membrane cellulaire. Il n'est pas certain que les ions potassium qui activent l'expulsion du sodium soient aussi les ions potassium absorbés par la cellule ; il est possible qu'il y ait des sites tout à fait séparés pour l'activation par le potassium et pour le transport du potassium.

Il apparaît maintenant vraisemblable que l'activation de la pompe à sodium par le potassium soit essentiellement identique dans les nerfs et les hématies ; mais, un autre mécanisme semblait, à première vue, séduisant pour le nerf. Le potentiel de repos de la membrane nerveuse est en fait un potentiel de diffusion du potassium créé par la tendance des ions potassium à diffuser à partir du nerf contre leur gradient de concentration. L'élimination du potassium externe augmente ce gradient et élève ainsi le potentiel, rendant l'intérieur de la cellule plus négatif. Hodgkin et Keynes se sont demandé si l'augmentation du potentiel était en elle-même suffisante pour arrêter l'expulsion du sodium. Ils ont étudié expérimentalement cette hypothèse de la façon suivante. Des axones de seiche furent chargés avec des ions sodium radioactifs et immergés dans de l'eau de mer renfermant une concentration de 10mM de potassium. Le taux d'expulsion du sodium fut d'abord mesuré dans l'eau de mer, puis avec une augmentation du potentiel de membrane par un moyen électrique à une valeur proche de celle normalement observée dans l'eau de mer sans potassium, et enfin sans hyperpolarisation.

sation électrique. La sortie du sodium restait uniformément constante. Cette expérience suggère que les modifications importantes de la sortie du sodium qui résultent de petites modifications de la concentration du potassium ne proviennent pas de modifications du potentiel de membrane.

Quant à la stochiométrie de la pompe, les résultats ne sont pas tous identiques. Post et Joly (I2) trouve qu'il y a un mouvement de 3 ions Na^+ pour 2 ions K^+ , tandis que Gill et Solomon (I3) trouvent un rapport de 1/1. Cependant, ce désaccord peut être le résultat de conditions expérimentales différentes durant les mesures. En effet, le rapport $\frac{3}{2}$ a été trouvé avec des globules rouges conservés au froid, et pour des mesures non réalisées dans des conditions d'équilibre. Le rapport $\frac{1}{1}$ au contraire a été déterminé avec des globules frais, pour des mesures réalisées dans des conditions d'équilibre.

3) INHIBITION DU TRANSPORT ACTIF PAR LES GLYCOSIDES

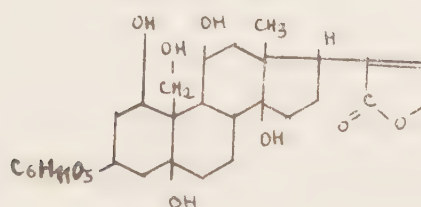
CARDIAQUES

Une autre caractéristique de la pompe à sodium fut découverte en 1953 par H.J.SCHATZMANN. Il constata qu'un groupe important de médicaments, Les glucosides cardiaques qui comprennent la digitaline et la ouabaïne, sont de puissants inhibiteurs

de la pompe à sodium dans les hématies. Ce fait a été confirmé pour de nombreux tissus, quoique la sensibilité des différents tissus aux médicaments soit variable, et l'inhibition par les glucosides cardiaques est devenu un instrument diagnostique important pour la pompe à sodium. Ces substances inhibent le transport sans affecter le métabolisme et Glynn (14) suggère qu'elles interfèrent directement sur l'une des étapes du transport. D'ailleurs, il démontra qu'il y a compétition entre les glycosides cardiaques et le potassium. En effet, l'inhibition de l'efflux de sodium produit par la ouabaïne est levée si on augmenté la concentration en KCl dans le milieu extracellulaire. Caldwell et Keynes montrèrent que des concentrations élevées d'ouabaïne injectée dans un axone de calmar ne parvenaient pas à bloquer la pompe, alors que des concentrations très basses ajoutées au milieu externe le faisaient. Cette dernière observation suggère que le point d'action de l'ouabaïne est à l'extérieur de la membrane cellulaire.

Beaucoup de travaux ont été réalisés afin d'étudier l'interaction des glycosides cardiaques avec les membranes. Des "ghosts" de globules rouges humains ont été incubés avec de la ouabaïne tritiée en présence d'ATP ; l'addition de Na^+ et de Mg^{2+} augmente le taux de liaison de ce stéroïde, tandis que le K^+ provoque l'effet contraire. La quantité de ouabaïne liée est parallèle au taux d'inhibition du transport (15).

La nature des liaisons formées et le mode d'action des glycosides cardiaques ne sont pas encore élucidés.



Formule de l'ouabaine

4) LA PERMEABILITE PASSIVE

Dans l'équilibre ionique des cellules, la perméabilité passive intervient au même titre que le transport actif. La plupart des travaux sont centrés sur la pompe à sodium, mais il faut se souvenir que l'activité de celle-ci est régulée par la concentration du sodium intracellulaire qui, d'une certaine façon, est fonction de la perméabilité de la membrane. Si la perméabilité devient telle que le sodium externe entre plus facilement, la pompe doit travailler plus vite pour maintenir l'état d'équilibre sans changer le sodium interne. Mais la vitesse maximum de celle-ci est une limite finie ce qui implique que la perméabilité de la membrane ne peut dépasser une certaine valeur pour que soit respecté l'équilibre ionique.

La perméabilité passive est-elle fonction du métabolisme, ou est-elle une propriété inhérente à la membrane ? En effet, les changements de la perméabilité observés lors des variations de pH et de force ionique peuvent être reliés aux variations de densité, des charges positives fixées sur la membrane. Mais, parallèlement, des inhibiteurs métaboliques tels le iodoacétate et le fluorure créent une augmentation sélective des mouvements passifs du potassium. Une autre observation qui n'a pas encore été expliquée est celle de l'augmentation de la perméabilité causée par l'adénosine ou les autres nucléotides. Quelque soit le mode d'action de ces composés, la perte du potassium par la cellule dépend sans aucun doute du calcium, puisque des agents complexants empêchent une telle fuite. Comme le suggèrent certains auteurs(16), cette perte pourrait provenir d'un trouble du transport actif du calcium dont le rôle est de maintenir le Ca^{2+} intracellulaire à une très faible concentration.

- Gardos (17) montra que les ions bisulfites produisent une fuite du potassium hors des hématies. La perméabilité revient à son état initial si des agents oxydants sont ajoutés dans le milieu. Ainsi, la perméabilité est-elle fonction du degré d'oxydoréduction des membranes.

- Enfin, deux autres résultats doivent être cités quant au contrôle de la perméabilité des cations.

I) Des composés organiques mercuriels, tel que le pa-

perchloromercuri-benzène (PCMBS) interagissent avec les membranes des globules rouges intacts et modifient la perméabilité des cations Na^+ et K^+ en agissant sur les groupes SH. Cette action est modifiée par l'addition de cystéine (18) (19).

- 2) Les antibiotiques cycliques, comme la valinomycine, augmente d'une façon sélective la perméabilité passive du potassium mais non celle du sodium (20).

Dans ce cas, les variations de perméabilité dépendent principalement de facteurs stériques, en particulier du rapport diamètre du cycle sur diamètre effectif de l'ion. De tels antibiotiques sont de grand intérêt dans la caractérisation des espèces de molécules de la membrane, qui sont impliquées dans la régulation de la perméabilité cellulaire. Une hypothèse attrayante est que les peptides cycliques possédant une enveloppe hydrophobe et une région interne hydrophile seraient capables de permettre aux ions K^+ , mais non aux ions Na^+ , de pénétrer dans cette région interne hydrophile. Ainsi, la perméabilité passive n'est pas une propriété statique de la membrane, mais une propriété dynamique.

5) LES AUTRES MODES D'ECHANGES IONIQUES A TRAVERS LES ----- MEMBRANES -----

Les mouvements des ions sont habituellement classés en

.../...

deux grands groupes selon qu'ils sont liés ou non à la pompe à sodium.

a) L'entrée du potassium couplée à une sortie du sodium ne sont pas les deux seuls flux ioniques liés au transport actif.

- Quoique la pompe à sodium puisse déplacer plus d'ions sodium vers l'extérieur à travers la membrane cellulaire que d'ions potassium vers l'intérieur, des ions potassium externes ont été nécessaires dans tous les cas cités jusqu'ici. Toutefois, il y a au moins deux autres modes de fonctionnement de la pompe à sodium qui ne requièrent pas de potassium dans le milieu externe et qui en fait ne se voient qu'en l'absence de potassium externe. Ceux-ci sont la diffusion d'échange du sodium dans laquelle le sodium interne est échangé pour du sodium externe, et la fuite de sodium accompagné d'un anion.

Il existe des preuves de l'existence d'une diffusion d'échange dans les fibres nerveuses, mais la preuve la plus indiscutable vient du récent travail de P.J. Garrahan et I.M.Glynn (21), (22), (23) sur les hématies. Quand des fantômes d'hématies sont remplis de sodium et d'ATP et immergés dans des milieux dépourvus de potassium, il n'y a pas de fuite appréciable, sensi-

ble à l'ouabaine, de sodium radioactif ; mais, quand l'expérience est répétée avec une concentration basse de sodium dans le milieu ou avec un taux intracellulaire élevé de sodium en même temps qu'un taux élevé d'orthophosphate, il y a une sortie considérable de sodium. Cette sortie est très réduite en éliminant complètement le sodium du milieu externe. Dans les conditions où il y a une sortie de sodium sensible à l'ouabaine, il y a une entrée équivalente de sodium sensible à l'ouabaine. Ainsi, il semble que le sodium interne s'échange avec le sodium externe par une voie sensible à l'ouabaine sans provoquer de perte nette de sodium de la cellule. D'autres expériences ont montré que ce processus d'échange exige de l'ATP, mais ne provoque pas une hydrolyse appréciable de celui-ci. L'addition de potassium au milieu externe abolit l'échange et l'énergie est alors nécessaire pour effectuer l'expulsion de sodium couplée à l'absorption de potassium. Ces observations soulèvent un certain nombre de questions intéressantes, mais l'observation cruciale est que le sodium peut être déplacé à travers la membrane cellulaire par une voie requérant de l'énergie et sensible à l'ouabaine, en l'absence de potassium externe.

Si la pompe catalyse un échange Na^+-Na^+ en l'absence de potassium externe, un mouvement K^+-K^+ doit aussi exister. En effet, de tels résultats ont été trouvés (24) avec des globules.

.../...

L'efflux de potassium sensible à l'ouabaïne est 25 fois plus grand dans une solution Ringer contenant du potassium que dans un Ringer sans potassium. Ce résultat suggère que l'efflux de K^+ est lié à l'influx de K^+ et que cet échange existe pendant le fonctionnement normal de la pompe.

La perte d'ions sodium accompagnés d'anions a jusqu'ici été observée seulement dans le nerf. Dans leurs premières expériences sur les axones de seiche, Hodgkin et Keynes ont constaté un passage de sodium requérant de l'énergie dans les solutions qui manquaient d'ions sodium et potassium. Dans des expériences plus récentes sur le nerf de crabe, Baker (25) a montré qu'il y a une fuite de sodium requérant de l'énergie et sensible à l'ouabaïne à partir des nerfs immergés dans les solutions dépourvues de sodium et de potassium où la pression osmotique est maintenue par de la choline ou du sucre. Dans ces conditions, les ions sodium se déplacent le long du gradient électrochimique, mais de l'énergie est encore nécessaire et environ trois ions sodium sont perdus pour chaque liaison phosphate ouverte. La fuite de sodium est accompagnée d'une sortie des anions de la cellule. Un certain nombre d'anions différents sont intéressés, entre autres le glutamate, l'aspartate et le phosphate, les trois principaux anions du nerf de crabe. L'addition de potassium au milieu externe supprime la sortie des anions sans beaucoup influencer celle du sodium ; le sodium externe abolit la

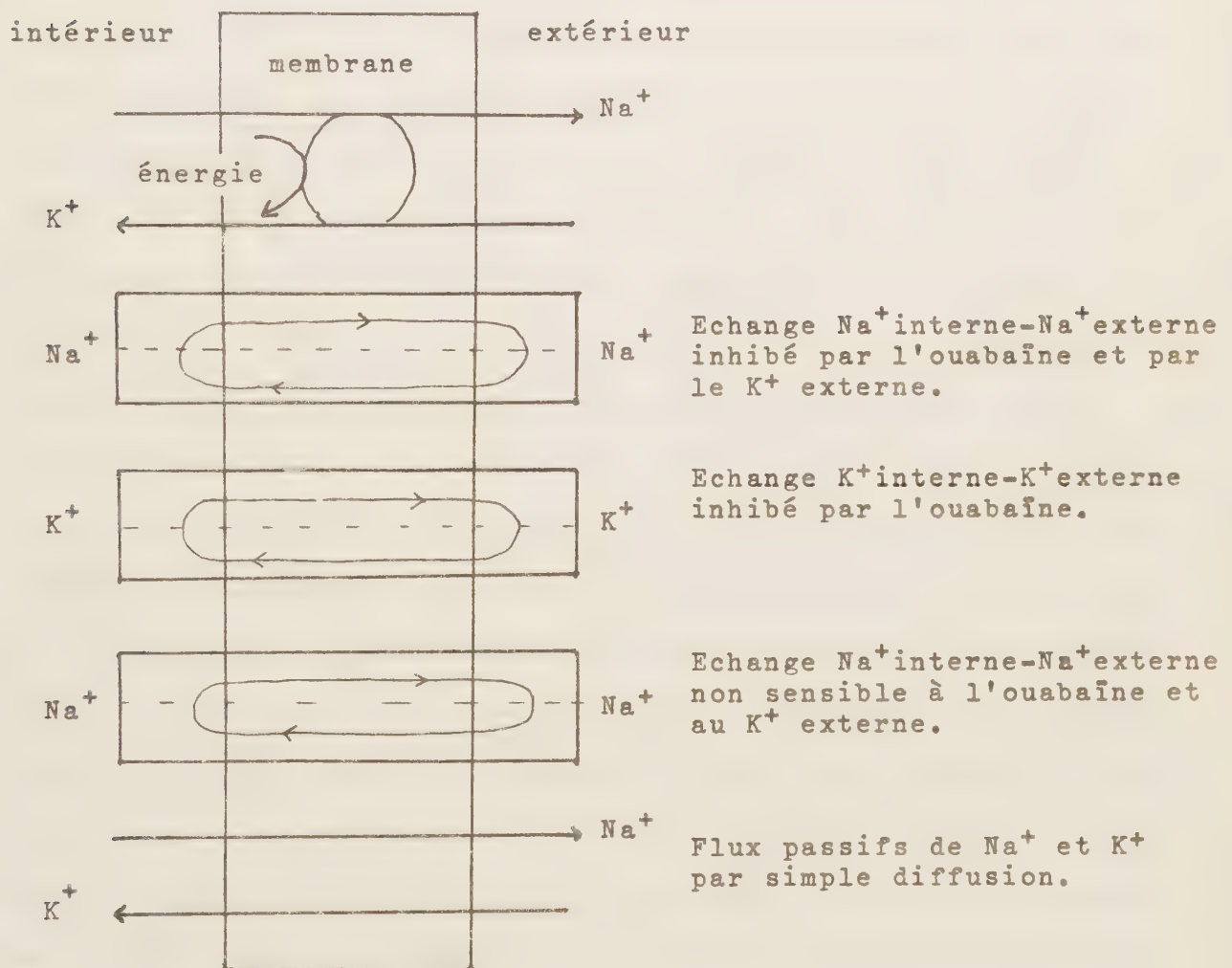
perte nette du sodium et la sortie des anions. Ces expériences indiquent qu'en l'absence d'ions sodium externes, les ions potassium externes ne sont pas indispensables au mouvement du sodium à travers la membrane des cellules nerveuses. On ne sait pas encore très bien si les anions font réellement partie du mécanisme de la pompe à sodium ou s'ils sont entraînés en dehors du nerf passivement par suite d'une augmentation marquée du potentiel de repos.

b) Mouvements des ions non liés à la pompe à sodium

Quand la pompe est inhibée, les cations peuvent diffuser le long de leurs gradients électrochimiques. Mais, à côté de cette simple diffusion, une autre forme de transport non relié à la pompe à sodium a été décrite. Sjodin et Beaugé (26) mirent en évidence, dans le muscle de grenouille, et en présence de ouabaine, un efflux de sodium. Celui-ci était insensible au potassium externe et diminuait considérablement si le sodium externe était remplacé par du lithium. Dans les globules rouges, en présence de glycosides cardiaques (27), l'efflux de Na^+ est augmenté si la concentration en sodium externe est élevée, et l'influx de Na^+ est augmenté si la concentration en sodium interne est plus importante. Ces résultats semblent montrer qu'il existe un système d'échange, spécifique pour le sodium puisque le lithium ne peut le remplacer, indépendant de la pompe.

.../...

On peut résumer les différents mouvements des cations Na^+ et K^+ par le schéma suivant :



6) MISE EN JEU ET LOCALISATION D'UN SYSTEME ENZYMATIQUE

L'ATP est habituellement métabolisé dans la cellule par des systèmes enzymatiques, et J.C. SKOU (28) s'est demandé si un système enzymatique possédant les propriétés de la pompe à sodium pourrait être isolé des cellules. Quand son premier article parut en 1957, il marqua un progrès important et des travaux ultérieurs ont confirmé ses résultats et les ont élargis à un grand nombre de tissus. Dans son premier travail, Skou avait utilisé du nerf de crabe et en avait isolé une fraction de membrane qui, en présence d'ions magnésium, était capable d'hydrolyser l'ATP. Le taux d'hydrolyse n'était que légèrement augmenté par l'addition séparément soit d'ions sodium, soit d'ions potassium ; mais, quand ces ions étaient ajoutés ensemble le taux présentait une augmentation importante. L'ouabaine arrêta cette hydrolyse. Ces observations furent étendues par R.L. Post et ses collaborateurs qui montrèrent que dans les hématies la concentration d'ions potassium nécessaire pour obtenir la moitié du taux maximal d'hydrolyse était très proche de celle requise pour une activation "demi-maximale", de la pompe à sodium dans les cellules intactes. De plus, Dunham et Glynn ont montré que l'efficacité de différents glucosides à inhiber l'hydrolyse était étroitement parallèle à leur action sur la pompe à sodium.

Quoique ces résultats suggèrent fortement que l'enzyme hydrolysant l'ATP fait partie du mécanisme de la pompe à sodium, il était encore capital de montrer que l'enzyme est présente dans la membrane cellulaire, que les points de dégradation de l'ATP et d'activation du sodium sont internes à la membrane cellulaire et que le point d'activation du potassium est externe.

Ces tâches ont maintenant été accomplies pour les hématies et les fibres nerveuses. En utilisant des "fantômes" d'hématies, I.M. Glynn, R.L. Post et R. Whittam, travaillant dans des laboratoires différents, ont tous montré qu'avec le potassium et l'ATP à l'intérieur du fantôme, le taux d'hydrolyse de l'ATP sensible à l'ouabaine est très bas, qu'il y ait ou non du potassium et du sodium dans le milieu externe. Toutefois, avec du sodium et de l'ATP dans le fantôme, le taux d'hydrolyse est élevé quand du potassium est présent dans le milieu externe et bas quand le potassium est absent. Les produits de l'hydrolyse de l'ATP - l'adenosine diphosphate (ADP) et l'orthophosphate - ne sont pas libérés dans le milieu entourant la cellule.

Une méthode plus directe d'étude de l'utilisation d'énergie de la pompe à sodium dans le nerf est celle de l'axone per-

fusé (I). Il est possible de faire sortir par pression le contenu protoplasmique d'un axone géant de calmar et de remplir la gaine aplatie avec une solution de composition chimique connue. Malgré ce traitement plutôt brutal, la membrane nerveuse est gardée en assez bon état et, à condition que le milieu de perfusion soit riche en ions potassium et ait la même pression osmotique et le même pH que l'eau de mer, l'axone perfusé conduira les influx nerveux.

Quand l'ATP est ajouté au perfusat, le taux d'hydrolyse dépendra de l'activité des enzymes hydrolysant l'ATP à la face interne de la membrane et dans l'axoplasme résiduel. Une augmentation marquée de la dégradation de l'ATP fut observée quand du sodium était placé dans le liquide de perfusion et cette augmentation était inhibée par l'introduction d'ouabaïne dans le milieu baignant. Ceci suggère que la membrane des nerfs du calmar renferme une adénosine triphosphatase, ATPase, douée de propriétés assez identiques à celles de l'ATPase des fantômes d'hématies. Depuis un grand nombre de travaux mirent en évidence une ATPase dans tous les tissus où l'ouabaïne inhibe le transport actif du sodium et du potassium et trouvèrent une relation entre l'activité de cet enzyme et l'importance du transport relatif à chaque tissu (rein, cerveau, cornée...). Il existe

.../...

par exemple deux variétés d'érythrocytes de moutons : les uns possèdent une concentration en potassium importante, les autres une forte teneur en sodium. Ces caractéristiques sont héréditaires. L'importance de la pompe pour les cellules riches en potassium est de quatre fois supérieure à celle des cellules pauvres en potassium. Or, le rapport des activités ATPasiques est le même (29), c'est-à-dire quatre pour un.

Ainsi, les propriétés de cet enzyme sont, qualitativement et quantitativement, les mêmes que celles du système transporteur :

- les deux systèmes sont localisés à l'intérieur de la membrane.
- les deux utilisent l'ATP (et non l'inosine triphosphate)
- les deux requièrent du magnésium, du sodium et du potassium.
- les effets inhibiteurs des glycosides cardiaques sont identiques pour les deux systèmes.

Ce chapitre nous conduit à la conclusion suivante : l'adénosine triphosphatase représente elle-même tout le mécanisme de la pompe, ou lui est très étroitement liée.

.../...

III) L'ADENOSINE TRIPHOSPHATASE

"Mg²⁺ - Na⁺ - K⁺ DÉPENDANTE"

La première difficulté rencontrée lorsque l'on veut étudier l'activité ATPasique en rapport avec le transport actif est due au fait qu'il existe dans les membranes deux composants ATPasiques : une activité "Mg²⁺-Na⁺-K⁺ dépendante" et une activité "Mg²⁺ dépendante". Le magnésium est nécessaire à ces deux composants pour hydrolyser l'ATP, mais seulement 50% environ de l'activité ATPasique totale est stimulée par le sodium et le potassium. Ainsi, seule l'ATPase "Mg²⁺-Na⁺-K⁺ dépendante" peut être reliée à la pompe à sodium.

Cette activité semble modulée par le système transporteur, d'où l'énorme intérêt de son étude pour essayer d'expliquer le mécanisme moléculaire du transport actif.

I) EXEMPLE DE PRÉPARATION DE STROMAS GLOBULAIRES

POSSEDANT UNE ACTIVITE ATPASIQUE

Tout dommage aux fragments de membranes dans lesquels l'ATPase est présente provoque une perte partielle ou totale

.../...

de l'enzyme qui est activée par les cations. Cela suggère qu'une certaine mesure d'organisation structurale est indispensable.

La plupart des laboratoires utilisent une suspension de fragments de membrane dont le mode de préparation varie selon les tissus.

Pour les globules rouges humains, les méthodes habituelles d'obtention de membranes par hémolyse brutale (30) nous ayant donné des résultats peu reproductibles dans nos conditions expérimentales, nous avons adopté la préparation suivante :

- Les membranes sont préparées à partir de sang frais recueilli sur héparine depuis moins de 12 heures ($500\text{u}/\text{cm}^3$). Les érythrocytes sont lavés deux fois avec du NaCl isotonique et les globules blancs sont éliminés par aspiration. L'ensemble des opérations est alors réalisé à 4°C .

- Le culot obtenu est mis en suspension pendant vingt minutes dans une solution légèrement hypotonique de pH 8 dont la composition est la suivante :

. Tris	4 mM/l
. Cystéine	2 mM/l
. NaCl	110 mM/l

.../...

- Cette préparation est hémolysée dans une cellule de filtration Diaflo dans laquelle on fait passer un courant continu d'une solution hypotonique (Tris : 4 mM/l - Cystéine : 2 mM/l - pH = 8).

- L'hémoglobine progressivement libérée est entraînée dans le filtre tandis que les globules restent dans la cellule. Le débit est réglé à environ 400 cc/heure et la filtration est arrêtée lorsque l'éluat est devenu incolore ce qui correspond en général à des membranes libres d'hémoglobine (1%).

- Le pH du milieu est ajusté à 7,5 et les membranes récupérées par centrifugation à 30.000 g pendant 30', sont congelées brutalement à -80°C afin de les fragmenter. Cette fragmentation augmente l'activité ATPasique de la préparation, en facilitant certainement l'accès du substrat au site enzymatique. Les membranes sont alors conservées à -25°C et elles peuvent être utilisées pendant huit jours environ.

2) MESURE DE L'ACTIVITE ATPASIQUE " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} DEPENDANTE"

Pour différencier les deux ATPases, deux milieux réactionnels sont employés. L'activité ATPasique totale est mesurée

.../...

après incubation d'une suspension de membranes dans un milieu réactionnel contenant "ATP-Mg²⁺-Na⁺-K⁺". Pour évaluer l'ATPase "Mg²⁺ dépendante", le milieu réactionnel contient en plus, de l'ouabaïne ou ne contient que de l'ATP et du magnésium. Par différence, on obtient ainsi l'ATPase "Mg²⁺-Na⁺-K⁺ dépendante".

Différentes méthodes pour la mesure de l'activité ATPasique sont utilisées :

- La plus fréquente est celle de la mesure du phosphate inorganique libéré par hydrolyse de l'ATP. Après un temps déterminé (une à deux heures) d'incubation à 37°C , la réaction est stoppée par addition brutale de trichloracétique glacé à 10%. Une centrifugation est effectuée et le phosphate inorganique est mesuré par la méthode de Fiske et Subbarow (31) qui est basée sur la coloration bleue donnée par le complexe acide phosphomolybdique réduit, en présence d'ions sulfites. Fiske et Subbarow utilisent l'acide amino I naphthol 2 sulfurique 4 comme agent réducteur. La coloration bleue est mesurée à 700 mμ . La méthode est sensible et permet de mesurer une concentration en phosphate dans l'échantillon, comprise entre 0,005 et 0,060mM/l.

Malheureusement, elle est longue à mettre en oeuvre et sujette à de nombreuses erreurs.

.../...

Parmi les causes d'erreur, on peut noter :

- formation de complexes phosphoprotéiques,
- réduction du molybdate qui donne un composé bleu,
- hydrolyse des dérivés phosphorylés en milieu acide, en particulier hydrolyse de l'ATP, de la créatine-phosphate.

Toutes ces causes d'erreurs peuvent être supprimées en utilisant les modifications suivantes.

Par addition d'acide trichloracétique, on précipite les protéines et la mesure est effectuée sur le surnageant.

La réduction du molybdate et son effet catalytique sur les liaisons phosphates organiques sont diminués par extraction du complexe phosphomolybdique sitôt sa formation. L'extraction se fait par un solvant organique, soit le mélange I/I benzène, isobutanol (32), soit par l'isobutanol pur (33). Cette méthode a aussi l'avantage de réduire l'hydrolyse en milieu acide des composés organiques phosphorylés. La gamme de mesure reste la même que précédemment.

Une autre technique est l'emploi d'ATP renfermant du phos-

phore radioactif (γ -ATP³²). Dans ce cas, la manipulation reste identique puisqu'il est nécessaire de séparer le phosphate sous forme de complexe phosphomolybdique par extraction par l'isobutanol.

La radioactivité est alors mesurée sur une aliquote de la solution d'acide phosphomolybdique dans l'isobutanol, soit sur un compteur β à bas bruit de fond, soit en scintillation liquide. Cette deuxième méthode semble préférable en raison de la difficulté qu'il y a de déposer sur les coupelles d'aluminium du compteur β un film d'isobutanol d'épaisseur homogène.

Dans l'un et l'autre cas, la précision n'est pas supérieure à celle obtenue précédemment après extraction par l'isobutanol, mais l'utilisation de l'ATP³² permet de travailler à des concentrations en substrat beaucoup plus faible qu'en colorimétrie.

Avec les deux méthodes citées précédemment, on évalue habituellement une activité globale de l'ATPase (phosphate en mM/l libéré/mg de protéines membranaires/heure d'incubation).

La méthode, mise au point par Kornberg, permet la mesure de la concentration en ATP restant dans le milieu réactionnel en fonction du temps, c'est-à-dire permet d'obtenir une vitesse

initiale. Les réactions enzymatiques suivantes interviennent :

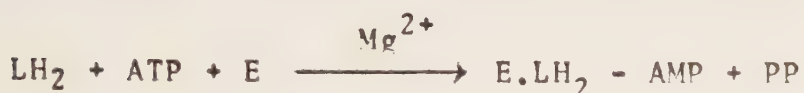


La réduction du Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate est suivie par l'augmentation de l'absorption à 340 mμ .

Cette méthode bien que rapide, est délicate à mettre en oeuvre. Il est en particulier nécessaire de réunir toutes les conditions de pH, de température, et de concentration en substrats, nécessaires à une bonne activité des enzymes hexokinase et glucose 6P déshydrogénase.

Pour caractériser de façon précise un enzyme dans des conditions de milieu données, il faut déterminer ses paramètres cinétiques, c'est-à-dire sa vitesse maximum apparente V_m et sa constante de demi-activation K_m . Cela nécessite une détermination des vitesses initiales à des concentrations en substrat faibles ($0 - 24 \mu\text{M/l}$), voisines du K_m de l'enzyme, pour obtenir une bonne précision.

Nous avons mis au point (35) une technique de mesures de vitesse initiale aux faibles concentrations en ATP. Cette méthode est basée sur le principe suivant : les vers luisants possèdent un système enzymatique "luciférine-luciférase" qui transforme l'énergie chimique de l'ATP en énergie lumineuse.



où E = luciférase, enzyme de nature protéique catalysant
l'oxydation du composé LH₂ AMP

LH₂ = luciférine

La cinétique de la réaction est d'allure Michaelienne et la quantité de lumière émise par unité de temps, ou vitesse de la réaction, peut être reliée à la concentration en ATP. L'erreur relative maximum faite sur la mesure d'une concentration en ATP est de 3% et la sensibilité de la méthode permet de mesurer des concentrations inférieures à 0,01 µM/l.

Au temps zéro, l'ATP est mis dans le milieu réactionnel où sont les membranes. Des prises sont faites à des intervalles de temps régulier et injectés dans un tampon glacé pour arrêter

la réaction ATPasique. La préparation "luciférine-luciférase" est ajoutée brutalement et la lumière émise est mesurée par un photomultiplicateur. On obtient ainsi une courbe correspondant à la variation de lumière en fonction du temps, ou encore variation d'ATP en fonction du temps d'hydrolyse si l'étalonnage du système luciférine-luciférase a été réalisé auparavant.

Les résultats sont rapides, précis et immédiatement utilisables, ce qui permet d'adapter le déroulement des expériences.

3) MECANISME DE LA REACTION ATPasique

Pour essayer de déterminer la séquence des réactions mises en jeu dans le processus du transport actif, un grand nombre de chercheurs ont essayé de marquer une partie du système pendant qu'il fonctionne normalement, d'isoler et de caractériser ensuite les groupements auxquels le marqueur s'est fixé.

Skou, en 1960 (36), détecta une formation d'ATP³² à partir de l'ADP³², ce qui montre que le dernier phosphate de l'ATP peut se fixer à l'enzyme pour former un intermédiaire phosphorylé et qu'il existe une réaction d'échange ADP-ATP.

.../...

Quand la préparation d'adénosine triphosphatase est traitée à l'ATP³², le degré de marquage dépend de la composition du milieu. Le marquage est faible en présence d'ions magnésium seuls, mais est notablement augmenté par l'addition d'ions sodium. L'incorporation d'ions sodium et potassium dans le milieu entraîne une forte réduction du marquage comparé à celui observé avec les ions sodium seuls. Cette réduction est contrecarrée par l'addition d'ouabaïne au milieu. Les résultats de l'une de ces expériences (37) sont montrés sur la figure 7.

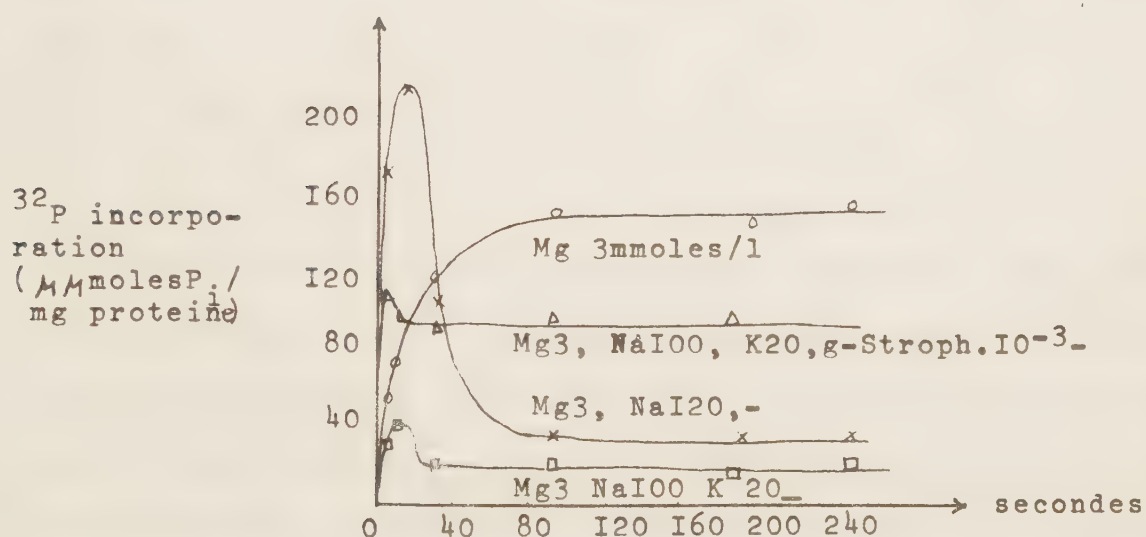


Fig.7 : Incorporation du P³² à partir de ATP³² dans le système enzymatique isolé par Skou (Skou 1965)

Ces résultats peuvent être interprétés en fonction de la phosphorylation et de la déphosphorylation de la membrane alternée au

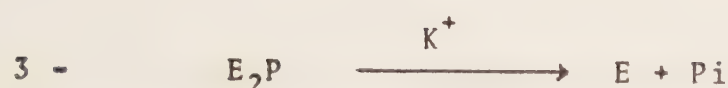
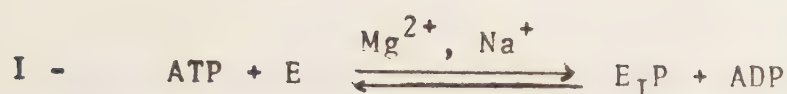
cours du pompage. La phosphorylation requiert du sodium et l'addition de potassium favorise la déphosphorylation par un mécanisme qui est bloqué par l'ouabaïne.

L'existence d'un intermédiaire phosphorylé a été prouvé seulement pour un petit nombre de tissus (reins, cerveau...) avec lesquels on pouvait obtenir une préparation ATPasique très active. Beaucoup d'essais pour relier la phosphorylation des membranes de globules rouges humains à l'ATPase ont échoué (38) (39) (40), car il existe pour ces membranes un haut niveau de phosphorylation non spécifique qui masque la petite quantité associée à la réaction ATPasique.

En réalité, il semble d'après les travaux de Fahn (41) que l'intermédiaire phosphorylé existe sous deux formes distinctes. En effet, la réaction d'échange ADP-ATP a lieu en présence d'une faible concentration en magnésium, tandis que la phosphorylation ne survient que pour des concentrations en magnésium plus fortes.

Ainsi, le schéma général de l'hydrolyse de l'ATP peut être décrit de la façon suivante :

.../...



où E est l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"

E_1P et E_2P représentent les deux formes de l'enzyme
phosphorylé

Pi : le phosphate inorganique

Un autre résultat expérimental est en faveur de l'existence des deux formes E_1P et E_2P . Le n éthylmaléimide (NEM) abolit l'activité ATPasique, mais augmente la réaction d'échange ADP-ATP. De plus, la quantité d'intermédiaire phosphorylé obtenue avec une préparation enzymatique traitée par le NEM n'est pas diminuée en présence de potassium. Le NEM inhiberait donc la conversion $\text{E}_1\text{P} - \text{E}_2\text{P}$. Les résultats obtenus après digestion enzymatique et électrophorèse semblent montrer que ces deux formes sont de nature chimique très voisine. Toutes les preuves témoignent d'une sorte de molécule protidique plutôt que d'un des constituants lipidiques de la membrane cellulaire. Le phosphate semble être combiné sous forme d'un acyl phosphate (42), mais personne n'a isolé et caractérisé les molécules en cause. Même quand ceci aura été fait,

.../...

il sera nécessaire de montrer que la molécule marquée fait réellement partie du mécanisme de la pompe et n'est pas simplement le résultat d'un artéfact du procédé d'isolement.

La dernière réaction du schéma d'hydrolyse est actuellement la source de nombreux travaux. En effet, la réaction ATPasique est composée de deux étapes : une phosphorylation de l'enzyme " Na^+ dépendante" suivie d'une hydrolyse " K^+ dépendante" de l'intermédiaire phosphorylé. Cette hydrolyse correspond à une activité phosphatasique stimulée par le potassium. Habituellement, activité ATPasique et activité phosphatasique étaient considérées comme deux manifestations différentes du même complexe enzymatique. Cette interprétation commença à être discutée lorsque l'on découvrit que l'oligomycine inhibait partiellement l'hydrolyse de l'ATP, mais non l'activité phosphatasique des membranes. L'éventualité de deux enzymes distincts fut alors suggérée, mais les travaux récents de Vigliocco et de GARRAHAN (43) (44) ne semblent pas confirmer cette hypothèse.

4) ASPECT STRUCTURAL DE L'ATPASE

On connaît encore très peu de choses sur la structure de l'ATPase malgré les nombreux travaux réalisés. Elle est en effet

.../...

composée de tout un ensemble d'unités catalytiques formant un complexe enzymatique. Pour analyser cette structure, il faut d'abord solubiliser la préparation de membranes. La plupart du temps, cela conduit à une disparition de l'activité ATPasique par destruction de l'organisation moléculaire. Mais des solubilisations partielles effectuées à l'aide de détergents non ioniques, comme le Triton X100 ou le Lubrol, semblent respecter en partie l'intégrité du complexe ATPase, donc le système transporteur. Bien que la détermination précise du poids moléculaire n'ait encore aucun sens, un certain degré de purification sur des préparations d'ATPase de cerveau a déjà été obtenu par des procédés de chromatographie et d'ultracentrifugation (45) (46). Le poids moléculaire estimé varie entre 200.000 et 500. 000.

IV) MODELES DE LA POMPE A SODIUM

De nombreux modèles hypothétiques ont été proposés pour expliquer en partie les propriétés de la pompe à sodium, mais tous ces modèles ne sont guère plus que des idées spéculatives. Jusqu'ici, il n'y a pas d'expériences qui puissent établir une distinction nette entre eux et la seule valeur de ces modèles est celle de fournir une infrastructure sur laquelle baser de futures expériences qui pourraient conduire à une connaissance plus approfondie. Les modèles sont tous basés sur une forme de molécule navette ou transporteuse qui peut transporter les ions à travers la membrane. Certains soutiennent la théorie qu'une molécule relativement petite pourrait former un complexe avec l'ion et ensuite traverser la membrane ; d'autres préfèrent la théorie d'une grosse molécule protidique qui peut modifier sa forme de sorte qu'un site en contact initialement avec la solution interne peut être amené en contact avec la solution externe.

.../...

I) MODELE UTILISANT UN TRANSPORTEUR

Ce modèle (Fig.8) est basé sur l'idée que l'affinité d'un transporteur cyclique est modifiée par combinaison avec du phosphate.

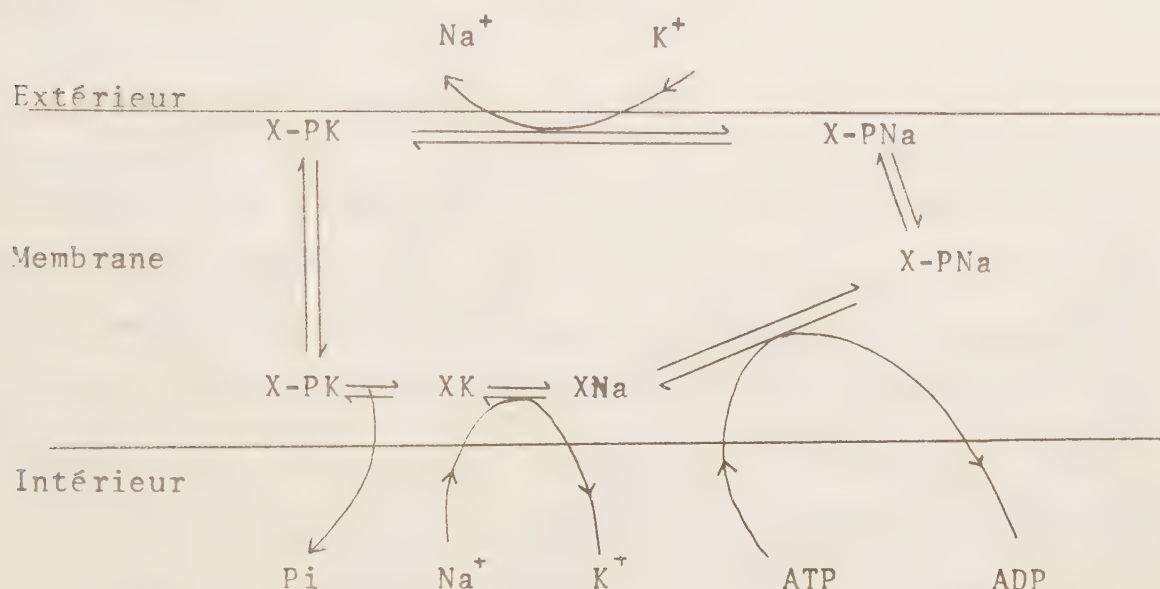


Fig.8

Pour expliquer la forte affinité pour le sodium à l'intérieur de la cellule et pour le potassium à l'extérieur, on admet que l'énergie métabolique est utilisée à convertir un transporteur qui a déjà une forte affinité pour les ions sodium et est "chargée" de sodium, en un transporteur à forte affinité pour le potassium. A la face externe de la membrane, si du potassium est présent, le transporteur réagira avec le potassium et retournera à l'intérieur de la cellule, où il est déphosphorylé et le potassium échangé pour du sodium. S'il n'y a pas de potassium externe et si du sodium est disponible, le sodium

externe tendra à s'échanger avec le sodium du transporteur avant que le transporteur retourne à l'intérieur de la cellule. En l'absence totale de potassium et de sodium externes, le sodium pourrait se dissocier du transporteur et le transporteur libre retourner à l'intérieur de la cellule.

Les propriétés de la diffusion d'échange peuvent être expliquées si le transporteur doit traverser la membrane au moyen d'une série de sites (S_1 , S_2 , S_3). Pour que la diffusion d'échange ait lieu, il doit être possible pour un transporteur de passer librement d'un côté de la membrane à l'autre par ces sites. Si plus d'un site est occupé et si l'échange de sodium entre les transporteurs est impossible, la diffusion d'échange sera réduite de beaucoup. Garrahan et Glynn ont observé que la diffusion d'échange était à son minimum avec des concentrations élevées de sodium interne et des rapports ATP/ADP et ATP/orthophosphate élevés qui favoriseraient la formation de transporteurs appelés à occuper les sites à travers la membrane. Au cours du pompage couplé, la réaction avec le potassium externe permet probablement au transporteur de retourner par une voie différente.

2) MODELE DE SKOU

Selon Skou (37), l'affinité du système enzymatique pour

.../...

l'un ou l'autre des deux cations est modifié par l'ATP. Le modèle est illustré fig.9. Le système transporteur représenté par TS est le système enzymatique lui-même. Il existe deux sites : i à l'intérieur, o à l'extérieur de la membrane. Juste à la fin d'un cycle, le système n'étant plus dans sa forme active, le site o à l'extérieur est occupé par du sodium Na^i qui vient d'être transféré, le site i à l'intérieur est occupé par du potassium K^o , les deux cations venant juste de traverser la membrane, n est le nombre d'ions transportés par cycle. Lorsque l'ATP se lie au système enzymatique, il l'active. Cette activation se traduit par un changement de configuration spatiale qui modifie l'affinité des sites. Le potassium prend la place du sodium sur le site o, le sodium la place du potassium au site i. L'ATP est alors hydrolysé et les cations sont transportés de site à site (fig.9b), par un processus qui est peut-être celui d'un transfert d'électrons (28).

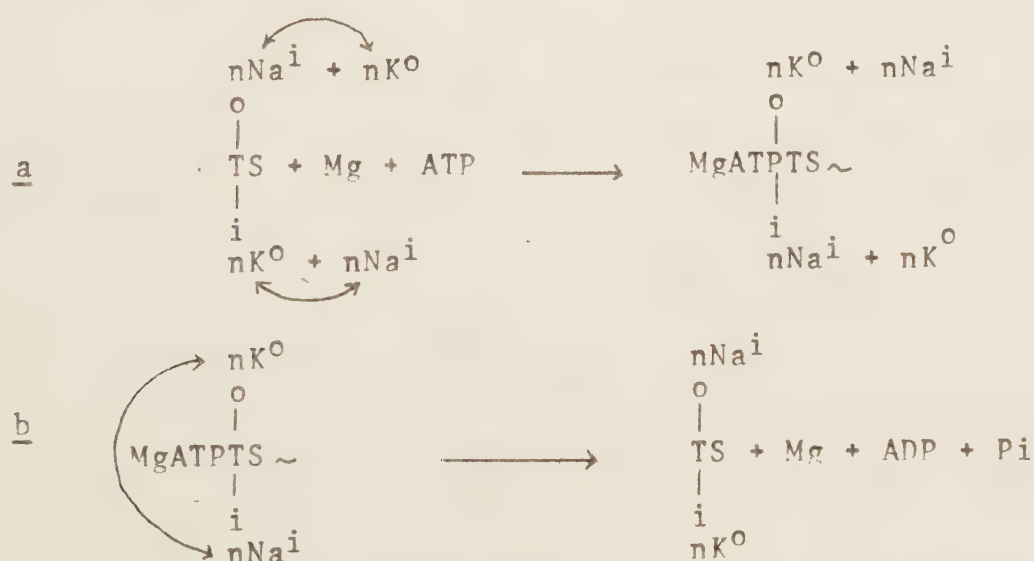


Figure 9

3) MODELE DE POST, SEN ET ROSENTHAL

Ces auteurs (48) ont proposé un modèle (fig.10) qui est à peu près le même que celui présenté (fig.8). Mais ici, les transporteurs sont deux protéines phosphorylées E_i et E_o , l'une assurant le transport de trois sodium, l'autre le transport de deux potassium. La déphosphorylation se fait du côté interne de la membrane.

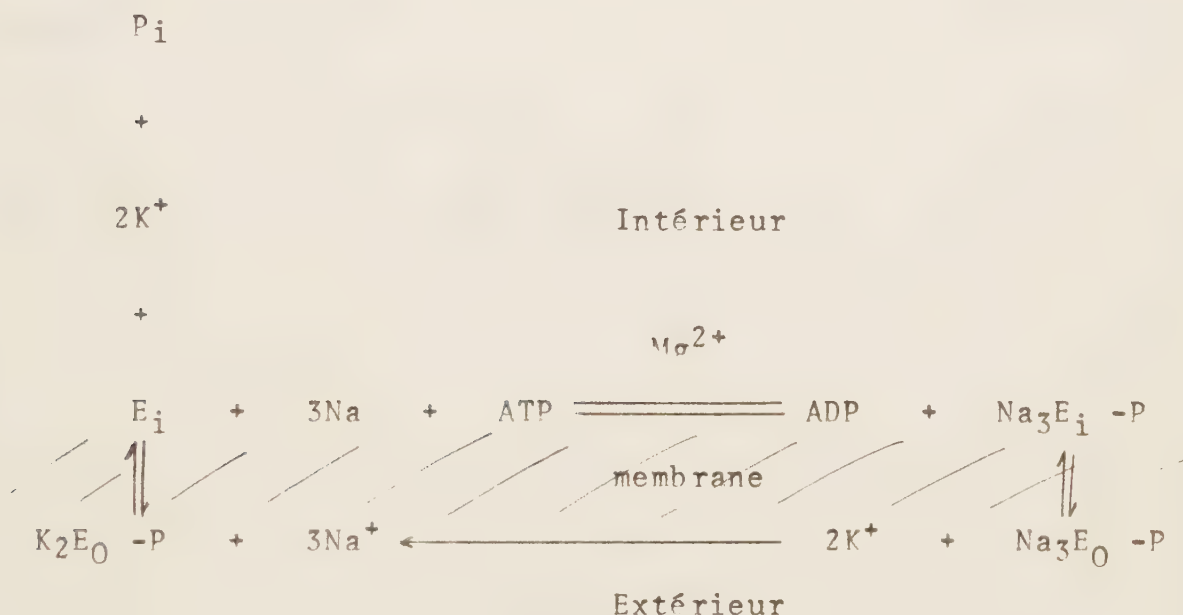


Figure 10

4) MODELE DE JARDESKY

Le modèle proposé par Jardetsky (49) est un modèle allostérique (Fig.II). La protéine dans son état initial (Fig.IIa) possède un site ayant une très haute affinité pour le sodium.

.../...

priétés principales de la pompe à sodium. En réalité, c'est l'existence ou non d'un transporteur qui est le réel problème, car elle implique la diffusion d'un complexe transporteur-cations à travers une membrane de 50-100 Å d'épaisseur. Le modèle de Jardetsky résout cette difficulté, puisque seuls les ions traversent la membrane.

Mais, l'exemple des peptides cycliques qui comme la valinomycine ou les gramicidines pourraient très bien convenir dans le rôle de transporteur doit être considéré comme un argument en faveur de l'hypothèse d'une molécule transporteuse et doit orienter nos recherches dans ce sens.

.../...

CONCLUSION

=====

Au cours de ce travail, nous avons voulu donner une revue des connaissances actuelles sur le transport actif des cations à travers les membranes biologiques.

La structure de celles-ci a été rappelée. Pendant longtemps, c'est l'aspect statique des structures membranaires qui fut étudié. Il apparaît aujourd'hui que leur rôle physiologique tient davantage aux processus dynamiques entre leurs constituants qu'à leur seule architecture. L'expérience accumulée a progressivement imposé l'idée que la membrane n'est pas une structure figée mais une organisation dynamique, susceptible d'adapter son architecture aux nécessités fonctionnelles. La structure lipoprotéique est le mode d'organisation qui se prête le mieux à ces changements de conformation. Dans des processus physiologiques

.../...

tels que l'activité électrique ou le transport des molécules, les méthodes d'étude physico-chimiques ont permis de donner un support expérimental à cette hypothèse.

Après avoir donné les principales caractéristiques du fonctionnement de la pompe à sodium, nous avons montré que celle-ci était intimement liée à l'activité d'un enzyme, l'adénosine triphosphatase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" localisé à l'intérieur de la membrane. Pour essayer de déterminer la séquence des réactions qui se succèdent dans les processus du transport actif, le comportement de cet enzyme a fait l'objet de très nombreux travaux, et nous avons décrit le mécanisme de la réaction ATPasique à la lumière des derniers résultats expérimentaux.

Le dernier chapitre de ce travail porte sur les différents modèles de pompe à sodium et montre que deux sortes d'hypothèses peuvent être discutées :

1) une macromolécule lipoprotéique possédant une activité ATPasique serait couplée à un grand nombre de petites molécules transporteuses. Ces molécules, lors de l'hydrolyse de l'ATP, sont phosphorylées, et ce sont elles qui vont assurer le va et vient des cations.

2) cette macromolécule représenterait à elle seule le système transporteur. Le contact avec le sodium ou le potassium amènerait un changement de configuration avec rotation de telle sorte

qu'un site en contact initialement avec le milieu intracellulaire peut être amené en contact avec le milieu extracellulaire.

Des expériences sur la purification du complexe ATPasique et sur la caractérisation de ses différents constituants permettront peut-être de choisir entre ces deux hypothèses.

Le transport actif conditionne la vie des cellules en assurant la régulation des concentrations ioniques. Nous espérons que les recherches mises en jeu permettront d'utiliser les résultats obtenus à la compréhension des manifestations pathologiques relevant d'un trouble de ce transport.

B I B L I O G R A P H I E
=====

- I - HODGKIN A.L.
"The conduction of the nervous impulse".
Liverpool University Press, Liverpool 1964
- 2 - KERNAN R.P.
"Cell K".
Butterworthes, Londres 1966
- 3 - USSING H.H.
Physiol. Rev. 29, 1949
- 4 - DANIELLI J.F. and DAVSON H.
J. Cellular Comp. Physiol. 5, 1935
- 5 - ROBERTSON J.D.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 1957
- 6 - LUCY J. A.
J. Theoret. Biol. 7, 1964
- 7 - BENSON A.A.
J. Am. Oil. Chem. Soc. 43, 1966
- 8 - LENARD J. and SINGER J.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1966
- 9 - CALDWELL P.C. , HODGKIN A.L. , KEYNES R.D. and SHAW T.I.
J. Physiol. Lond. 152, 1960
- IO - GARDOS G. and STRAUB F.B.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 12-I, 1956
- II - GLYNN J.
J. Physiol. London 134, 1956

- I2 - POST R.L. and JOLLY P.C.
Biochim. and Biophys. Acta 25, 1957
- I3 - GILL T.J. and SOLOMON A.K.
Nature 183, 1959
- I4 - GLYNN I.M.
J. Physiol. London 136, 1957
- I5 - ALBERS R.W. , KOVAL G.J. , SIEGEL G.J.
Mol. Pharmacol. 4, 1968
- I6 - WHITTAM R.
Nature 219, 1968
- I7 - GARDOS G.
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. I, 1966
- I8 - SUTHERLAND R.M. ; ROTHSTEIN A. , WEED R.I.
J. Cell. Physiol. 69, 1967
- I9 - GARRAHAN P.J. , REGA A.F.
J. Physiol. 69, 1967
- 20 - KAMIYA M. , UTIDA S.
S. Comp. Biochem. Physiol. 26 1968
- 21 - GARRAHAN P.J. , GLYNN I.M.
J. Physiol. London 192, 1967
- 22 - GARRAHAN P.J. , GLYNN I.M.
Ibid. 192, 1967
- 23 - GARRAHAN P.J. - GLYNN I.M.
J. Physiol. London 192, 175-88, 1967

.../...

- 24 - LANT A.F. , WHITTAM R.
J. Physiol. London 199, 1968
- 25 - BAKER P.F.
J. Physiol. London 180, 1965
- 26 - SJODIN R.A. , BEAUGE L.A.
J. Gen. Physiol. 52, 1968
- 27 - LUBOWITZ H. , WHITTAM R.
J. Physiol. London 202, 1969
- 28 - SKOU J.C.
Prog. Biophys. Chem. 14, 1964
- 29 - TOSTESON D.C.
Federation Proc. 22, 1963
- 30 - DODGE J.T. , MITCHELL C. and HANAHAN D.J.
Arch. Biochem. Biophys. 1963
- 31 - FISKE C.H. , SUBBAROW Y.
J. Biol. Chem. 66-375, 1925
- 32 - DOTY MARTIN
Anal. Chem. 21, 965, 1949
- 33 - WEIL-MALHERBE H. , GREEN R.H.
Biochem. J. 49 (3) 1951
- 34 - KORNBERG A.
Methods in enzymologie 2, 1955
- 35 - JALLET P. , LAGET P. , GUERIN H. , PIERI J.
Biochimie (à paraître)

- 36 - SKOU J.C.
Biochem. Biophys. Acta 42, 6, 1960

- 37 - SKOU J.C.
Physiol. Rev. 45, 595, 1965

- 38 - WHITTAM R.
The molecular mechanism of active transport in the
neurosciences
313-26, Press, New York 962pp 1967

- 39 - HOFFMAN J.P.
Am. J. Med. 41, 666-80, 1966

- 40 - HOFFMAN J.F. , KREGENOW F.M.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, 566-76, 1966

- 41 - FAHN S. , KOVAL G.J. , ALBERS R.W.
J. Biol. Chem. 243, 1968

- 42 - KAHLENBERG A. , GALSWORTHY P.R. , HOKIN L.E.
Arch. Biochem. Biophys. 126, 1968

- 43 - VIGLIOCCO Ana M. , REGA Alcides F. , GARRAHAN P.J.
Journal of Cellular Physiology 73, 3, 1970

- 44 - GARRAHAN P.J. , POUCHAN Maria I. , REGA A.F.
J. Physiol. 202, 1969

- 45 - KAHLENBERG , DULAK , DIXON , GALSWORTHY and HOKIN
Arch. Biochem. Biophys. 131, 1969

- 46 - MIZUNO K. , NAGANO K. , NAKAO T. , TASHIMA Y. , FUJITA M. ,
NAKAO M.
Biochim. Biophys. Acta 168, 1968

- 47 - SKOU J. C.
Prog. Biophys. 14, 1964
- 48 - POST R. L. , SEN A. K. and ROSENTHAL A. S.
J. Biol. Chem. 240, 1965
- 49 - JARDETZKY O.
Nature 211, 1966

T A B L E D E S M A T I E R E S =====

INTRODUCTION

I - ULTRASTRUCTURE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

II - CARACTERISATION DU TRANSPORT ACTIF DES CATIONS

- Source d'énergie
- Mouvement des ions - couplage $\text{Na}^+ - \text{K}^+$
- Inhibition du transport actif par les glycosides cardiaques
- La perméabilité passive
- Les autres modes d'échanges ioniques à travers les membranes
- Mise en jeu et localisation d'un système enzymatique

III - L'ADENOSINE TRIPHOSPHATASE " $\text{Mg}^{2+} - \text{Na}^+ - \text{K}^+$ DEPENDANTE"

- Exemple de préparation de stromas globulaires possédant une activité ATPasique
- Mesure de l'activité ATPasique " $\text{Mg}^{2+} - \text{Na}^+ - \text{K}^+$ dépendante"
- Mécanisme de la réaction ATPasique
- Aspect structural de l'ATPase

IV - MODELES DE LA POMPE A SODIUM

- Modèle utilisant un transporteur
- Modèle de Skou
- Modèle de Post, Sen et Rosenthal
- Modèle de Jardestky
- Conclusion

CONCLUSION

